

## SERELISA® BLV Ab Mono Blocking

### KIT PER LA RICERCA DEGLI ANTICORPI ANTI-gp 51 DEL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA (BLV) IN CAMPIONI DI SIERO (INDIVIDUALE O A POOL)

Secondo le direttive di: D.M. n. 358 del 2 maggio 1996,  
D.Lgs. 22-5-1999 n. 196 (applicabile solo in Italia)

### TECNICA IMMUNOENZIMATICA BLOCKING 384 reazioni a pozzetto singolo

#### I. PRINCIPIO DEL TEST

Il SERELISA® BLV Ab Mono Blocking kit utilizza una tecnica immunoenzimatica blocking volta alla scoperta degli anticorpi della glicoproteina (gp 51) presenti sulla superficie della parete in campioni di siero. In accordo con i regolamenti della Comunità Europea, il kit permette di scoprire un campione positivo in un pool di dieci sieri.

E' necessario eseguire tre passaggi:

- Ogni campione viene messo in un pozzetto sensibilizzato con la glicoproteina di superficie BLV gp 51. Gli anticorpi anti-gp 51 presenti nel campione si legano in modo specifico all'antigene virale adeso al pozzetto.
- Dopo un lavaggio, si aggiunge un coniugato anti-gp 51 monoclonale con perossidasi. Si fissa alle immunoglobuline bovine (anticorpi) catturate in precedenza, formando un complesso:  
(Ag gp 51) - (anti-gp 51 Mab/ perossidasi).
- L'eccesso di coniugato non legatosi, viene eliminato da un secondo lavaggio. L'enzima che si lega al complesso formatosi viene rivelato dall'aggiunta di un substrato che lo trasforma in un prodotto colorato. Le densità ottiche corrispondenti vengono lette ed interpretate usando un valore soglia ottenuto attraverso l'utilizzo del controllo positivo.
  - In assenza di anticorpi nel campione in esame, si evidenzierà una reazione con una intensa colorazione dovuta alla trasformazione dell'enzima del coniugato che si è legato alla fase solida della gp 51 libera.
  - In presenza di anticorpi anti-gp 51 nel campione in esame, la quantità minore di enzima del coniugato si legherà ai siti liberi della gp 51 nella fase solida e di conseguenza la colorazione diminuirà.

#### II. COMPOSIZIONE DEL KIT E CONSERVAZIONE

REAGENTI PURI	RICOSTITUZIONE E CONSERVAZIONE
4 micropiastre contengono 6 strip da 2x8 pozzetti sensibilizzati con il virus della Leucosi Bovina gp 51.	Usare entro 4 settimane dall'apertura della busta che deve essere richiusa dopo l'uso.
Coniugato Mab anti-gp 51/perossidasi (CJ) (concentrato 10x)	Diluire nel CD 10 volte. Usare entro 24 ore dopo la diluizione.
Tampone substrato perossidasi (PS)	Pronto all'uso.
Controllo Negativo (N)	Pronto all'uso.
Controllo Positivo (P)	Pronto all'uso.
Diluyente campione (SD)	Pronto all'uso.
Soluzione lavaggio (W) (concentrata 10 volte)	Diluire 10 volte con acqua distillata o demineralizzata. Usare entro 48 ore dalla preparazione.
Diluyente coniugato (CD)	Pronto all'uso.
Soluzione stoppante (S)	Pronto all'uso.
Pellicole adesive	12 films

**Nota:** Il kit e i reagenti diluiti dovrebbero essere conservati a +5 ± 3°C ed utilizzati come sopra descritto.

Reference : SBLV1.NI version n°1 – 17/11/2010

#### III. MATERIALI E REAGENTI RICHIESTI (NON FORNITI)

- Acqua distillata o demineralizzata.
- Pipette monocolanale a volume variabile o set di pipette in grado di misurare da 0 a 1000 µl. Il limite di tolleranza deve essere ≤ 10% per volumi ≤ 10 µl e ≤ 5% per tutti gli altri volumi.
- Cilindri graduati (100 ml e 1000 ml).
- Lavatore manuale, automatico o semi-automatico per lavaggio di micropiastre.
- Lettore di micropiastre, con filtri per lettura bicromatica a 450 e 630 nm. E' altresì possibile l'utilizzo di un lettore monocromatico dotato di filtro a 450 nm.
- Termostato a 37 ± 3°C

#### IV. AVVERTENZE

La qualità dei risultati dipende dal rispetto delle buone pratiche di laboratorio (vedi paragrafo VI).

- Non mescolare o unire reagenti di kit con differente numero di lotto.
- Non usare reattivi dopo la data di scadenza.
- Portare tutti i reattivi a temperatura di laboratorio almeno 1 ora prima dell'uso. Attenzione: portare a temperature ambiente solo i reattivi che verranno usati.
- Maneggiare tutti i reagenti ed i campioni come materiale pericoloso.
- Tenere tutti i reattivi lontani dalla pelle e dagli occhi. Se dovesse accadere, lavare immediatamente con acqua fredda.
- Non pipettare mai con la bocca.
- Evitare la contaminazione del campione durante il prelievo, la conservazione o il trasporto. Cambiare il puntale della pipetta per ogni campione.
- Evitare la contaminazione della soluzione tampone substrato con ioni metallo, con agenti ossidanti o con detergenti. Assicurarsi della perfetta pulizia dei vari recipienti. Non usare lo stesso recipiente o lo stesso puntale della pipetta per il coniugato e per il tampone substrato.
- Si raccomanda di smaltire i reagenti e i materiali contaminati secondo le norme vigenti. Le schede di sicurezza per il prodotto sono disponibili su richiesta.

#### Segnale di rischio e per la sicurezza:

R35: causa gravi ustioni

S26: In caso di contatto con gli occhi lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S30: Non versare acqua sul prodotto.

S45: In caso di incidente, ricorre immediatamente all'aiuto di un medico.

#### V. CAMPIONI

Il test è eseguibile su campioni di siero, singoli o a pool (fino ad un massimo di 10 campioni). I campioni dovrebbero essere conservati secondo la seguente tabella:

Campioni	Freddo (+5°C)	Ghiaccio (-20°C)	Lab Temperatura (+23°C)
Siero individuali o a pool	max. 7 giorni	Si	No

#### VI. PROCEDIMENTO

Eseguire esattamente quanto indicato nella sottostante metodica. Usare i controlli negativi e positivi in doppio per ogni sessione lavorativa e per ciascuna piastra.

#### A. PASSAGGI PRELIMINARI

Eseguire con la massima accuratezza la distribuzione e l'identificazione dei controlli e dei campioni.

Preparare i sieri che devono essere esaminati.  
Eseguire una diluizione 1:10 in una provetta vuota, in una micro piastra vuota o direttamente nel pozzetto della micropiasta in esame (90 µl di diluente campione + 10 µl siero singolo o a pool).

## B. TEST PROCEDURA

### I - DISTRIBUZIONE DEI CAMPIONI E DEI CONTROLLI

#### 1. Distribuzione dei controlli:

I controlli sono pronti all'uso.

Dopo aver miscelato le bottigliette, aggiungere 100 µl di controllo negativo (N) ai pozzetti A1 e A2 e 100 µl di controllo positivo (P) ai pozzetti B1 e B2.

#### 2. Distribuzione dei campioni:

**Singoli:** Mettere in ogni pozzetto 100 µl del siero precedentemente diluito 1:10.

Per eseguire la diluizione direttamente nel pozzetto, mettere 90 µl di diluente campione a cui aggiungere 10 µl di siero del campione.

Agitare bene.

**Pool:** Per eseguire la diluizione direttamente nel pozzetto: mettere 90 µl di diluente campione a cui aggiungere 10 µl di siero dei campioni precedentemente miscelati (10 µl x 10 campioni).

Agitare bene.

Il campione può essere analizzato in singolo o in doppio.

- Le strisce dei micro pozzetti devono essere sempre montate sul telaio in modo da facilitare il lavaggio e la lettura dei campioni.
- Coprire i pozzetti con una pellicola adesiva, se possibile, tagliata della lunghezza necessaria a seconda del numero di strisce utilizzate.
- Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore assicurandosi della perfetta miscelazione
- I campioni e i controlli dovranno essere distribuiti secondo il seguente schema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85
B	NC	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86
C	PC	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
D	PC	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
E	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
F	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
G	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
H	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92

#### 3. Incubazione della piastra

Protocollo con incubazione overnight (14-18 ore) a +5 ± 3°C.

#### LAVAGGIO:

Preparare una quantità sufficiente di soluzione di lavaggio diluendo 1:10 la soluzione di lavaggio concentrata (W) con acqua distillata o demineralizzata.

Rimuovere delicatamente la pellicola adesiva e procedere al lavaggio per 4 volte.

### II - AGGIUNTA DEL CONIUGATO

#### 1. Preparazione del coniugato:

Preparare la soluzione coniugato diluendo il coniugato concentrato (CJ) nel diluente coniugato (CD) alla diluizione 1:10 (2 ml sono necessari per una striscia; mettere 200 µl di CJ in 1,80 ml di CD).

#### 2. Distribuzione del coniugato:

Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di coniugato diluito.  
Coprire con un nuovo foglio di plastica adesiva.

#### 3. Incubazione del coniugato:

Incubare per 1 ora ± 5 minuti in frigorifero (+5 ± 3°C) oppure per 30 ± 5 min a +37 ± 3°C

**LAVAGGIO:** Rimuovere delicatamente la pellicola adesiva e procedere al lavaggio per 4 volte.

### III - SVILUPPO

#### 1. Aggiunta del substrato:

Aggiungere 100 µl di tampone substrato perossidasi (PS) in ogni pozzetto.

Non coprire con la pellicola adesiva. Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore assicurandosi della perfetta miscelazione.

#### 2. Incubazione del substrato:

Incubare 30 ± 5 min a temperature ambiente (+20 ± 5°C), al riparo dalla luce.

#### 3. Aggiunta della soluzione stoppante:

Aggiungere 50 µl di soluzione stoppante (S) in ogni pozzetto.

Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore. Assicurarsi che nei pozzetti non vi sia formazione di bolle.

#### 4. Misurazione della densità ottica:

Misurare la densità ottica (OD) bicromaticamente a 450 e a 630 nm o monocromaticamente a 450 nm (nella banda gialla).

E' vivamente raccomandata la lettura bicromatica. Se si usasse un lettore monocromatico, prima della lettura assicurarsi della pulizia sotto i singoli pozzetti della piastra.

## VII. VALIDAZIONE DEL TEST

I risultati di ciascun test sono validi se:

- la media dei valori delle densità ottiche OD del controllo negativo (N) è > 0.500.e

- la percentuale delle densità ottiche OD del controllo positivo (P) è > 80%

Questa percentuale può essere calcolata nel seguente modo:

$$\%campione = \frac{OD N - \overline{OD Campione}}{OD N} X 100$$

## VIII. CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sono possibili due metodi per l'interpretazione ed il calcolo dei risultati:

### PRIMO METODO: CALCOLO DELLA PERCENTUALE (% CAMPIONE)

Per ogni campione:

$$\%campione = \frac{OD N - \overline{OD Campione}}{OD N - \overline{OD P}} X 100$$

OD = media delle densità ottiche se il test è eseguito in doppio.

Ogni campione di siero che presenta una percentuale competitiva (% campione) ≥ 50 % deve essere considerato positivo.

Ogni campione di siero che presenta una percentuale competitiva (% campione) < 30 % deve essere considerato negativo

Ogni pool di sieri che presenta una percentuale competitiva (% campione) ≥ 30 % deve essere considerato positivo

Ogni pool di sieri che presenta una percentuale competitiva (% campione) < 30 % deve essere considerato negativo

**Zona dubbia:** Ogni campione individuale di siero che presenta una percentuale compresa tra 30 e 50%, deve essere considerato come campione dubbio e deve essere ritestato. Se il valore dubbio viene riconfermato, deve essere eseguito un secondo test da un differente prelievo sullo stesso soggetto.

### SECONDO METODO: ANALISI DELLE DENSITA' OTTICHE

Calcolare la densità ottica del cut off corrispondente al 30% ed al 50% e comparare la media della densità ottica di ciascun campione con la OD CO 30 e con la OD CO 50.

OD CO 30 = 0.70	$\overline{OD N} + 0.30$	$\overline{OD P}$
OD CO 50 = 0.50	$\overline{OD N} + 0.50$	$\overline{OD P}$

**Interpretazione dei risultati.**

		OD CO 30	OD CO 50
individuale	-	+/-	+

		OD CO 30
pool	-	+

In caso di problemi o di domande, contattare:  
 SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming  
 69367 LYON Cedex 07 – France  
 Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10  
 www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

AD ESCLUSIVO USO VETERINARIO/  
 DA USARSI SOLO IN VITRO

Impianti certificati per la protezione dell'ambiente